



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                                                                                       |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | Dextran dextrinaseの触媒機構および細胞局在性の解明 [全文の要約]                                                                                                                            |
| Author(s)           | 貞廣, 樹里                                                                                                                                                                |
| Description         | この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。<br><a href="https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/">https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/</a> |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                                                                                 |
| Degree Name         | 博士(農学)                                                                                                                                                                |
| Dissertation Number | 甲第11816号                                                                                                                                                              |
| Issue Date          | 2015-03-25                                                                                                                                                            |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/58932">https://hdl.handle.net/2115/58932</a>                                                                                     |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                                                                       |
| File Information    | Juri_Sadahiro_summary.pdf                                                                                                                                             |



# 学位論文の要約

博士の専攻分野の名称 博士（農学）

氏名 貞廣 樹里

## 学位論文題名

### Dextran dextrinase の触媒機構および細胞局在性の解明

dextran は $\alpha$ -1,6 グルコシド結合を主鎖とする多糖であり、研究分野の他に医薬・食品・化粧品などの産業分野で利用がある。酢酸菌 *Gluconobacter oxydans* 由来 dextrin dextranase (DDase) は  $\alpha$ -1,4 結合からなる maltodextrin の非還元末端から順次グルコシル基を転移し dextran を形成する反応を触媒する。本研究では、DDase の触媒機構および細胞局在性の究明を目的とした。

#### （１）組換え菌体外 DDase の生産と諸性質の解析

大腸菌を用いて組換え菌体外 DDase を生産し、動的解析と生成物分析を行った。DDase は maltotetraose (G4) から maltotriose (G3)と maltopentaose を生成した。すなわち、反応初期では $\alpha$ -1,4 転移のみを触媒し、既報と異なる結果が得られた。基本的性質は天然酵素に類似した。

#### （２）活性ドメインの推定および触媒残基の機能解析

DDase は 5 ドメイン構造と推測され、活性に必須なドメインを決定した。触媒ドメイン様の構造体には、配列類似酵素の作用に必要なアミノ酸（２つの触媒残基を含む）が認められた。触媒アミノ酸〔酸塩基触媒残基 (AB) と求核触媒残基 (NU)〕の候補に変異を導入すると、酵素活性を失った。AB の置換酵素では G4 に対する活性が著しく低下したが、 $\alpha$ -glucosyl fluoride に対しては大きな低下がなかった。親酵素は  $\beta$ -glucosyl fluoride を基質にしないが、NU の候補に嵩の小さな非求核性アミノ酸を導入すると、 $\beta$ -glucosyl fluoride を供与体とする G3 への転移反応を触媒した。以上の結果から、前述の候補は AB や NU として機能することが示された。

#### （３）dextran 合成機構

DDase は連続的な  $\alpha$ -1,6 転移反応により dextran を合成する。しかし、反応初期にはマルトオリゴ糖への不均化反応が優先的に行われた。また、非還元末端に  $\alpha$ -1,6 グルコシル基を有す分子種は受容体として微弱であった。従って、生成された受容体が酵素に結合したまま、鎖長伸長する processive 機構で dextran が生産されると判断した。

#### （４）菌体外と菌体内 DDase の同一性と培養による細胞局在性の変化

菌体外と菌体内に存在する DDase は異なるとの報告があるが、両者は反応や蛋白質特性が同じであり同一酵素と判断した。菌体内 DDase は細胞内ではなく細胞表層に局在した。一方、培養初期の glucose 存在下では遊離型（菌体外）のみであり、glucose が枯渇すると表層結合型となり蓄積した。従って、培養時期により局在性が変化した。

#### （５）菌体からの DDase 遊離因子および菌体との結合領域

菌体からの DDase の遊離を調べ、生成物の dextran が直接的な遊離因子であると判定した。菌体と組換え酵素との結合実験から、配列の末端部分に結合領域が存在した。従って、maltodextrin 培養で生産される dextran が結合を阻害するため細胞表層に結合できないが、glucose 培養では dextran 合成がないため、細胞表層に結合すると結論した。